

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

DIALOG(R) File 347:JAPIO

(c) 1999 JPO & JAPIO. All rts. reserv.

03116774

BACTERIAL DECOMPOSITION OF ALIPHATIC CHLORINE COMPOUND AND BACTERIUM THEREOF

PUB. NO.: 02-092274 [J P 2092274 A]

PUBLISHED: April 03, 1990 (19900403)

INVENTOR(s): UCHIYAMA HIROO

YAGI OSAMI

NAKAJIMA TOSHIAKI

TABUCHI TAKESHI

APPLICANT(s): KOKURITSU KOGAI KENKYUSHO [000000] (A Japanese Government or Municipal Agency), JP (Japan)

APPL. NO.: 63-239753 [JP 88239753]

FILED: September 27, 1988 (19880927)

INTL CLASS: [5] C12N-001/20; C02F-003/34; C12N-001/20; C12R-001/01

JAPIO CLASS: 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY -- Microorganism Industry); 28.1 (SANITATION -- Sanitary Equipment); 32.2 (POLLUTION CONTROL -- Waste Water Treatment)

JOURNAL: Section: C, Section No. 731, Vol. 14, No. 290, Pg. 112, June 22, 1990 (19900622)

#### ABSTRACT

PURPOSE: To decompose volatile aliphatic chlorine compounds such as trichloroethylene contained in industrial waste water, to remove and to make the compounds harmless by bringing a specific bacterium belonging to the genus Methylosinus into contact with the aliphatic chlorine compounds.

CONSTITUTION: A bacterium belonging to the genus Methylosinus, capable of decomposing aliphatic chlorine compounds, is brought into contact with the aliphatic chlorine compounds to decompose the aliphatic chlorine compounds. Methylosinus trichosporium TSUKUBA, a methane assimilating bacterium growing in methane or methanol as only one carbon source and decomposing trichloroethylene. The bacterium applied is deposited as FERM P-10004 in Fermentation Research Institute of Agency of Industrial Science and Technology. The bacterium has properties of decomposing trichloroethylene and various relative compounds and has ability of decomposing 10ppm high-concentration trichloroethylene to half in 10 days.

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-92274

⑤ Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)4月3日

C 12 N 1/20  
C 02 F 3/34  
// (C 12 N 1/20  
C 12 R 1:01)

F 8515-4B  
Z 7432-4D

審査請求 有 請求項の数 4 (全4頁)

⑭ 発明の名称 脂肪族塩素化合物の微生物的分解方法及びその微生物

⑯ 特 願 昭63-239753

⑰ 出 願 昭63(1988)9月27日

⑱ 発 明 者 内 山 裕 夫 茨城県つくば市並木2丁目1876番地 211棟304号  
⑱ 発 明 者 矢 木 修 身 茨城県つくば市並木3丁目1211番地 555棟  
⑱ 発 明 者 中 島 敏 明 茨城県つくば市春日3丁目10番地17号 高野荘202号室  
⑱ 発 明 者 田 淵 武 士 東京都狛江市岩戸南2丁目26番地5号  
⑲ 出 願 人 国立公害研究所長 茨城県つくば市小野川16-2  
⑲ 代 理 人 弁理士 小松 秀岳 外2名

## 明 細 書

### 1. 発明の名称

脂肪族塩素化合物の微生物的分解方法及びその微生物

### 2. 特許請求の範囲

- (1) メチロシナス(Methylosinus)属に属し、脂肪族塩素化合物分解能を有する微生物を、脂肪族塩素化合物又はその含有物と接触させることを特徴とする脂肪族塩素化合物の分解方法。
- (2) 微生物がトリクロロエチレンを分解するメタン酸化性細菌である請求項(1)記載の方法。
- (3) 微生物がメチロシナス・トリコスボリウム・TSUKUBA(微工研菌寄No.10004)である請求項(1)又は(2)に記載の方法。
- (4) メタン酸化性であり、トリクロロエチレンを分解するメチロシナス・トリコスボリウム・TSUKUBA(微工研菌寄No.10004)。

### 3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は微生物による飽和及び／又は不飽和脂肪族塩素化合物の分解方法及びその方法に用いる新規微生物に関するものである。

更に詳しくは工場からの排水又は排ガス中、或いは土壤中等に含まれるトリクロロエチレンのような揮発性脂肪族塩素化合物の微生物による分解除去方法に関するものである。

[従来の技術]

工場からの排水又は排ガス、或いは土壤中には各種有機塩素化合物が混入されており、近時、環境汚染等の問題から、これらの有効な除去が注目されることとなっている。

殊にトリクロロエチレン(TCE)は、IC産業等で用いられている難分解性化合物であり、発ガン性を有し、地下水汚染物質として問題になっている。

従来、排水中或いは排ガス中から、トリクロロエチレンのような有機塩素化合物を除去するには、活性炭による吸着除去法等が行われてきたが、これらは多量の吸着剤や特別の装置及び

設備を必要とするものであり、必ずしも効率的かつ経済的な除去手段とはなっていない。

一方、有機塩素系化合物の効率的かつ簡便な分解除去手段として、微生物を用いる方法もいくつか試みられ報告されている。

例えば、ロドトルラ属、クラドスポリウム属、キャンデイダ属、サッカロミセス属及びストレプトミセス属の微生物等を用いてポリクロル化されたビフェニルのような有機塩素化合物を分解除去する例（特開昭48-98085号、特開昭48-98086号、特開昭49-6186号）、及びメチロシナス属、メチロシスチス属、メチロコッカス属及びメチロバクテリウム属の細菌のようなメタン酸化性細菌を用いて、m-クロルトルエンのようなハロゲン置換ベンゼンを分解する例（特開昭55-127198号）が報告されている。

しかしながらトリクロロエチレン及びその類は化合物のような脂肪族塩素化合物を有効に分解除去する微生物については報告されていない。  
〔発明の解決しようとする課題〕

よびメタノールを唯一炭素源として生育し、トリクロロエチレンを分解するメタン酸化性菌であるメチロシナス・トリコスポリウム・TSUKUBA からなるものである。

本発明の微生物は、各種土壌に広く分布しこれから採取し得られるが、その採取の方法としては、例えば次のような方法を用いる。

すなわち、培養はブチルゴム栓及びアルミシールで密閉したバイアル瓶を用い、30℃にて振とうする。トリクロロエチレン量はヘッドスペースより気相を一定量取り、ガスクロマトグラフィにより定量し、ヘンリーの法則式より液相濃度を算出する。

前記手段を用い、例えば採取した土壌を1ppmトリクロロエチレン及びメタンの存在下で馴致培養を繰り返し、トリクロロエチレンをよく分解する混合微生物系を得る。トリクロロエチレンの分解には酸素及びメタンが必須であることから、混合微生物系からメタノトローフの単離を行う。

そこで、トリクロロエチレンのような脂肪族塩素化合物を効率的に分解除去し、無化するためには、微生物を用いるような手段が望まれていたが、そのためには、まずそれらの化合物を有効に分解する微生物が必要であり、したがって、そのような新規微生物の提供とそれを用いた有害化合物の分解除去方法の開発とが強く要望されていた。

〔課題を解決するための手段〕

本発明者は、トリクロロエチレンのような脂肪族塩素化合物を分解する微生物を鋭意探索の結果、土壌中より、トリクロロエチレンを好氣的に分解する菌を単離し、この微生物を用いて、前記化合物を分解除去する方法を発明するに至った。

すなわち、本発明は、

(1) メチロシナス属に属し、脂肪族塩素化合物分解能を有する微生物を、脂肪族塩素化合物又はその含有物と接触させることを特徴とする脂肪族塩素化合物の分解方法、及び(2) メタンお

本発明において単離された菌は、公知のメチロシナス・トリコスポリウムに属するメチロシナス・トリコスポリウム・TSUKUBA である。

この菌を顕微鏡で観察すると、巾 0.6~1 μm、長さ 1~5 μm の短桿菌で以下の表に示すような特性を有するものである。

#### Characteristics of methane-utilizing bacteria

Gram stain	Negative
Cell shape	Short rod
Number of flagella	0
Motility	-
Growth on	
methane	+
ethane	-
propane	-
n-butane	-
dimethylether	-
methylamine	-

methanol	+
ethanol	-
nutrient broth	-
Growth at 30℃	+
37℃	+
45℃	-
Mol% G+C OF DNA	64.5
Major fatty acid	C <sub>18:1</sub> (98.5%)
Hydroxy fatty acid type	2-OH
Quinone type	Q <sub>8</sub>

以上の菌学的性質に基づき、本発明のメチロシナス菌株の同定を行った。

本発明のメチロシナスの菌株は、菌の形態、グラム染色などの顕微鏡的所見、生理学的諸性質などから、公知菌メチロシナス・トリコスポリウムOB 3bの性状について記載した文献(1. Journal of General Microbiology 61, 205-218(1970)、2. Microbial Growth on C<sub>1</sub> Compounds p. 123~133(1984)、3. Journal of

General Applied Microbiology 33, 135~165 (1987)) に記されているWhittenburyら、および駒形らの分類に基づき、メチロシナス・トリコスポリウムOB 3bに近縁の株と同定された。

しかしながら、鞭毛を有せずC<sub>18</sub>の飽和脂肪酸も有せず、また、ロゼットを形成しない点で、メチロシナス・トリコスポリウムOB 3bとは明らかに相違し、新菌株と同定され、メチロシナス・トリコスポリウム・TSUKUBAと命名された。

本発明の菌は工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第10004号として寄託されている。

本発明の菌はトリクロロエチレン及びその各種類縁化合物、すなわち、シス-1,2-ジクロロエチレン、トランス-1,2-ジクロロエチレン、1,1-ジクロロエチレン、1,1,2,2-テトラクロロエタン、1,1,2-トリクロロエタン、1,2-ジクロロエタン、クロロホルムを分解する性質を有し、10ppmの高濃度トリクロロエチ

レンを10日間で約半分に分解する能力を持つ。

本発明の方法を実施するに当っては、本発明の微生物を予め適当な培地にて培養し、それをトリクロロエチレン或いは該化合物を含有する排水或いは排ガス等と溶液状態で接触させることによって行われる。

#### 実施例(分解実験例)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.45g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.17g
NH <sub>4</sub> Cl	2.14g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	4.8mg
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	121mg
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	28mg
MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.6mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.05mg
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1mg
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.06mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.01mg
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 8H <sub>2</sub> O	0.6mg
NiSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.06mg

H<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> 0.04mg

D. W. pH 7.2

を蒸溜水1000mlに溶解し、トリクロロエチレン、(クロロホルム又はその他の脂肪族塩素化合物)及びメタンと空気の下、1~10日間30℃で培養、接触させ分解を行った。

その結果を次表に示す。

トリクロロエチレンの分解(パーセント)

口数 濃度ppm	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.035		0	82	94						
0.35			0	4	88	90				
1.0				0	3	23	92	91		
3.5							0	73	91	90
10							0	2	24	58

他の脂肪族塩素化合物の分解 (パーセント)

分解化合物	日数	4
シス-1,2-ジクロロエチレン	1ppm	88
トランス-1,2-ジクロロエチレン	1ppm	89
1,1-ジクロロエチレン	0.1ppm	43
1,2-ジクロロエタン	1ppm	100
1,1,2-トリクロロエタン	1ppm	92
1,1,2,2-テトラクロロエタン	1ppm	22
クロロホルム	1ppm	99

## 〔発明の効果〕

以上説明したように、本発明の新規微生物を使用することにより、難分解性の汚染物質を効率的に分解することができる。

特許出願人 国立公害研究所長

代理人 弁理士 小松 秀 岳

代理人 弁理士 旭 宏

代理人 弁理士 加々美 紀雄